

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-302660

(43)Date of publication of application : 31.10.2001

(51)Int.Cl. C07D327/04  
G01N 21/78  
G01N 31/22  
G01N 33/52  
G01N 33/68

(21)Application number : 2000-130617

(71)Applicant : WAKO PURE CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 28.04.2000

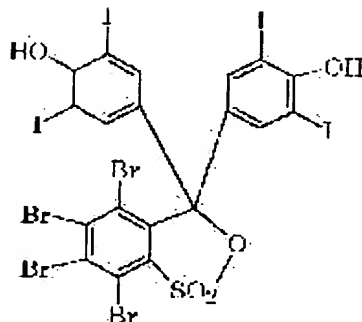
(72)Inventor : **TANIGUCHI MASAOKI  
TATENO MOCHIOH  
DATE MUTSUHITO  
MIMATA IKUZO**

**(54) INDICATOR FOR DETERMINATION OF PROTEIN**

**(57)Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a more sensitive indicator and a test piece for the determination of protein.

**SOLUTION:** This indicator is 3', 3'', 5', 5''-tetraiodophenol-3,4,5,6- tetrabromosulphophthalein expressed by formula (1), and an indicator for the test piece for the determination of protein comprising the compound and the test piece for the determination of protein.



17

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-302660  
(P2001-302660A)

(43) 公開日 平成13年10月31日 (2001. 10. 31)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 0 7 D 327/04		C 0 7 D 327/04	2 G 0 4 2
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	A 2 G 0 4 5
31/22	1 2 1	31/22	1 2 1 F 2 G 0 5 4
33/52		33/52	C 4 C 0 2 3
			B

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-130617 (P2000-130617)  
(22) 出願日 平成12年4月28日 (2000. 4. 28)

(71) 出願人 000252300  
和光純薬工業株式会社  
大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号  
(72) 発明者 谷口 雅亮  
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内  
(72) 発明者 館野 望浦  
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内  
(72) 発明者 伊達 睦廣  
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

最終頁に続く

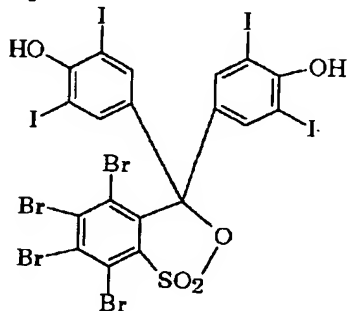
(54) 【発明の名称】 蛋白質測定用指示薬

(57) 【要約】

【課題】 より高感度の蛋白質測定用指示薬及び試験片を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明は、下記式〔1〕

【化1】



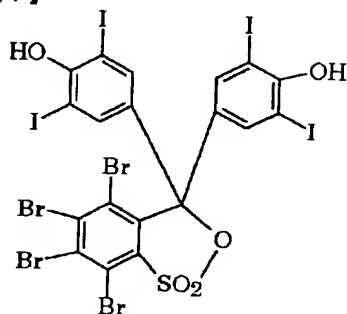
〔1〕

で示される3', 3'', 5', 5''-テトラヨードフェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレイン、該化合物を含んで成る蛋白質測定用試験片の指示薬及び蛋白質測定用試験片。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記式〔1〕

【化1】

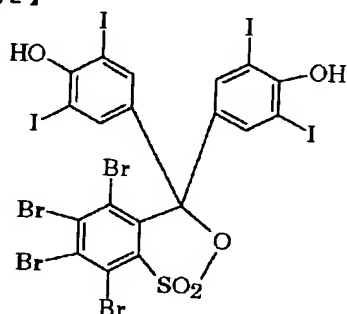


〔1〕

で示される3', 3'', 5', 5''-テトラヨードフェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレイン。

【請求項2】 下記式〔1〕

【化2】

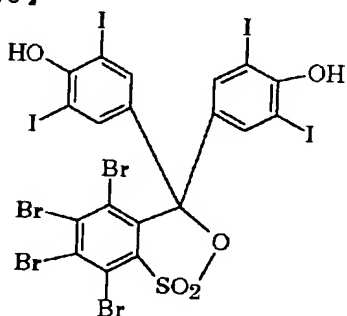


〔1〕

で示される3', 3'', 5', 5''-テトラヨードフェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレインを含んで成る蛋白質測定用試験片の指示薬

【請求項3】 下記式〔1〕

【化3】



〔1〕

で示される3', 3'', 5', 5''-テトラヨードフェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレインを指示薬として含む蛋白質測定用試験片。

【請求項4】 増感剤としてポリプロピレングリコールを含んで成る請求項3に記載の試験片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、血清、血漿、尿等の生体試料中に存在する蛋白質を測定するための指示薬及び試験片に関する。

【0002】

【従来の技術】生体試料中の蛋白質を測定することは、様々な病理学的診断に於いて重要である。例えば、血清中に豊富に含まれるアルブミンは、水に溶けやすく、血液と組織との間の水分バランスを調節し、また血中に存在するビリルビン、脂肪酸、胆汁色素、薬剤等の水難溶性物質と結合して、これらを運搬する役割を担っている。従って、肝臓の機能低下等により血清アルブミンの量が減少した場合には、浮腫、血清流動体の蓄積等の生理的障害をもたらす。また、腎炎、ネフローゼ症候群、結石、腫瘍等の腎・尿路疾患、循環系及び中枢神経系の疾患等により、尿中の蛋白質が増加する。従って、蛋白質を測定することは、これらの疾患の診断に於いて特に重要な指針となり得るのである。

【0003】現在、蛋白質測定分野に於いては、蛋白質誤差指示薬を含浸させた試験片を用いた測定が、簡便な方法として知られており、テトラブロムフェノールブルー（TBPB）を蛋白質誤差指示薬として用いた尿試験紙が、一次スクリーニング用として広く用いられている。TBPBは、蛋白質が存在すると、本来は解離しない低いpH3付近でフェノール性ヒドロキシル基の解離が起こり、黄色から青色に変化する。試験紙はこの色の変化を表示する為、蛋白質を検出することができる。

【0004】しかしながら、このTBPBを指示薬として用いた試験紙は、臨床的に必要とされる10~20mg/dl（痕跡量）程度の低濃度蛋白質に対する検出感度が不十分な為、蛋白質を正確に検出できない場合がある。即ち、カラーチャートと比較することにより行う目視判定に於いては、陰性蛋白質と痕跡蛋白質の色が近いために区別が難しく判定が困難であり、また近年普及してきた尿試験紙の測定装置に於いても、感度が低いためにしばしば判定を誤る場合がある。そこで、TBPB以外でこのような目的の指示薬となり得る化合物の開発が望まれている現状にある。

【0005】

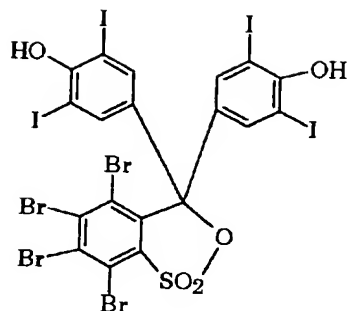
【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記した如き現状に鑑みなされたもので、より高感度の蛋白質測定用指示薬及び試験片を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、下記式〔1〕

【0007】

【化4】



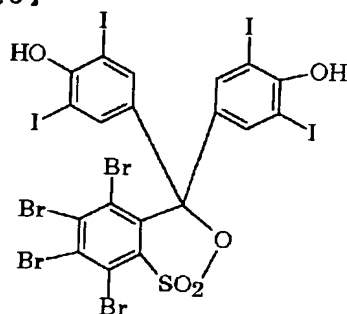
[1]

【0008】で示される3', 3'', 5', 5''-テトラヨードフェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレイン、の発明である。

【0009】また、本発明は、下記式[1]

【0010】

【化5】



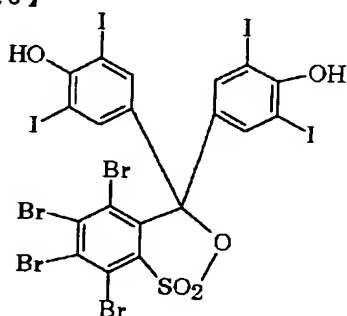
[1]

【0011】で示される3', 3'', 5', 5''-テトラヨードフェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレインを含んで成る蛋白質測定用試験片の指示薬、の発明である。

【0012】更に、本発明は、下記式[1]

【0013】

【化6】



[1]

【0014】で示される3', 3'', 5', 5''-テトラヨードフェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレインを指示薬として含む蛋白質測定用試験片、の発明である。

【0015】即ち、本発明者等は、生体試料中の蛋白質、特に低濃度の蛋白質を高感度で測定するための蛋白質測定用試験片の指示薬となり得る化合物を開発すべく

鋭意研究した結果、式[1]で示される3', 3'', 5', 5''-テトラヨードフェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレイン（以下、TITBSと略記する。）が目的の指示薬として好適であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0016】本発明に於ける蛋白質測定用試験片は、式[1]で示されるTITBSを指示薬として含んでなる試験片である。

【0017】本発明の蛋白質測定用試験片は、本発明の指示薬であるTITBS、緩衝剤、要すれば界面活性剤、増感剤等を含有する含浸液に吸収性担体を浸み込ませ、これを乾燥させることにより作製し得る。また、該試験片はそのまま用いてもよいが、好みの形状に切断し、要すれば非吸収体に接着させてもよい。

【0018】TITBSの使用濃度は、特に限定されないが、含浸液中、通常0.1mM~2mM、好ましくは0.3mM~0.6mMである。

【0019】緩衝剤としては、pH 2.5~4.5の範囲で良好な緩衝能を有し、指示薬であるTITBSと蛋白質との反応を阻害しないものであれば何れでもよいが、例えばグリシン緩衝液、クエン酸緩衝液、コハク酸緩衝液、リンゴ酸緩衝液、酒石酸緩衝液等が挙げられる。

【0020】緩衝剤の使用濃度は、特に限定されないが、含浸液中、通常0.1M~1.5M、好ましくは0.3M~1Mである。また、該溶液のpHとしては、本願の指示薬であるTITBSのpKa値よりやや低い値に設定するのが好ましく、通常2.5~4.5、好ましくは3.0~4.0の範囲から適宜選択される。

【0021】界面活性剤としては、蛋白質の測定を阻害するような性質を有さないものであれば何れでもよく、特に限定されないが、例えばポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、例えばポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリエチレングリコールモノラウレート、テトラエチレングリコールデシルエーテル等の非イオン性界面活性剤、例えばステアリルベタイン、2-アルキル-N-カルボキシルメチル-N'-ヒドロキエチルイミダゾリニウムベタイン等の両性界面活性剤、例えばコール酸、デオキシコール酸、ポリオキシエチレンアルキルフェノールエーテル硫酸ナトリウム等の陰イオン性界面活性剤等が挙げられる。これら界面活性剤は単独で用いても、或いは二種以上適宜組み合わせ用いてもよい。

【0022】これら界面活性剤の使用濃度は、特に限定されないが、含浸液中、通常0.05~5w/w%、好ましくは0.1~1w/w%となるように適宜選択して用いられる。

【0023】増感剤としては、ポリプロピレングリコー

ル、ポリエチレングリコール、ポリカーボネート、ポリビニルエーテル等が挙げられ、好ましくはポリプロピレングリコールが挙げられる。

【0024】これら増感剤の使用濃度は、特に限定されないが、含浸液中、通常0.05～5w/w%、好ましくは0.1～1w/w%となるように適宜選択して用いられる。

【0025】吸収性担体としては、蛋白質成分を含まない、例えば多孔性のシート状乃至膜状物、フォーム（発泡体）、織布状物、不織布状物、編物状物等が挙げられる。これらの素材としては、天然、半合成又は合成の繊維状等が挙げられ、これら素材を、抄紙、製膜、発泡成型、編製、織製等に、常法により成型することにより得ることができる。これら素材の具体例としては、例えば、綿、麻、セルロース、濾紙、ロックウール、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ガラス繊維、シリカ繊維、カーボン繊維、ボロン繊維、ポリアミド、アラミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセテート、レーヨン、ポリエステル、ナイロン、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリオレフィン等が挙げられる。

【0026】これら吸収性担体の形状は、特に限定されないが、矩形乃至方形や円形乃至楕円形が一般的である。

【0027】非吸収体としては、例えばポリエチレンテレフタレート、ポリエステル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリスチレン等の材質からなるシート状乃至膜状物が挙げられる。

【0028】本発明に係る3', 3'', 5', 5''-テトラヨードフェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレインを製造するには、例えば、先ずフェノールとテトラブロモ-*o*-スルホン安息香酸とを、硫酸又はルイス酸触媒の存在下、要すれば適当な溶媒を用いて反応させ、次いで、得られたフェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレインとヨウ素とを、塩基性水溶液中で反応させればよい。

【0029】上記反応に於ける反応溶媒としては、具体的には、例えば塩化メチル、ジクロロメタン、クロロホルム、テトラクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、1,1,

5, 6-テトラブロムスルホンフタレインの粗体 49.1g (0.073mol) を得た。（収率73%）

元素分析値 (C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S) 計算値 (%) : C 34.06, H 1.50

実測値 (%) : C 34.03, H 1.52

【0036】(2) 3', 3'', 5', 5''-テトラヨードフェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレイン (TITBS) の合成

0.48N水酸化ナトリウム水 1.75L中に、上記(1)で得られた粗体フェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレイン 49.1g (0.0729mol) とヨウ素 149.7g (0.599mol) を添加し、45℃で45分間加熱撹拌した。反応終

2, 2-テトラクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、フェノール等が挙げられ、これらは夫々単独で用いても、2種以上適宜組み合わせて用いてもよい。

【0030】ルイス酸触媒としては、例えば塩化スズ、塩化亜鉛、塩化アルミニウム、塩化チタン等が挙げられ、これらは夫々単独で用いても、2種以上適宜組み合わせて用いてもよい。

【0031】塩基性水溶液としては、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム等の水酸化物等の塩基性化合物を、水に溶解したものが挙げられる。

【0032】反応時間は、通常1～20時間、好ましくは1～10時間である。反応温度は、反応温度や出発物質の量により異なるが、通常0～300℃、好ましくは0～200℃である。上記以外の反応操作及び後処理等は、通常行われる同種反応に準じて行えばよい。

【0033】上記の如く、本発明のTITBS含浸試験片は、従来指示薬として使用していたTBPBを含んでなる試験片よりも高感度に蛋白質を測定でき、更には10～20mg/dlの痕跡量蛋白質についても高感度に測定できるという利点を有する。

【0034】以下に実施例を挙げ、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0035】

【実施例】実施例1

(1) フェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレインの合成

フェノール 75.0g (0.80mol) とテトラブロモ-*o*-スルホン安息香酸 50.0g (0.1mol) との混合液に、塩化亜鉛 12.4.9g (0.92mol) を加え、150～160℃で3時間加熱撹拌した。反応終了後、反応液を氷水に加えた後、酢酸エチル 500ml を加え、分液して目的物を抽出した。得られた有機層に1N塩酸 500ml を加えて酸性とした後、1N水酸化ナトリウム 500ml を加え、再び分液して目的物を抽出した。次いで、得られた水層に3N塩酸 500ml を加えて酸性とした後、酢酸エチル 500ml を加え、分液して目的物を抽出した。酢酸エチルを留去し、フェノール-3, 4,

了後、反応溶液を氷冷し、3N塩酸水溶液 500ml を加えて酸性とした後、酢酸エチル 500ml を加えて、分液して目的物を抽出した。得られた有機層にチオ硫酸ナトリウム水溶液 500ml を加え分液洗浄した後、0.5N塩酸水溶液 500ml を加え、再び分液して目的物を抽出した。次いで、酢酸エチルを留去し、酢酸-メタノール溶媒で結晶化させ、3', 3'', 5', 5''-テトラヨードフェノ

ール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレイン (TITBS) 26.1g (0.022mol) を得た (収率30.5%、融点300℃以上)。尚、このようにして結晶化した目的

元素分析値 (C<sub>19</sub>H<sub>6</sub>Br<sub>4</sub>I<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S·C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR δ ppm (CD<sub>3</sub>OD) : 7.630 (4H, -C<sub>6</sub>H<sub>2</sub> (I<sub>2</sub>) (OH))

【0037】実施例2 TITBSを指示薬とする蛋白質測定用試験片を用いたアルブミンの測定

(1) 試料の調製

(2) 試験片の作製

・ A液	クエン酸一水和物	5.68g
	クエン酸三ナトリウム二水和物	3.07g
	蒸留水	全容量 50ml (pH 3.3)
・ B液	TITBS	46.9mg (0.04mmol)
	ホリブ <sup>®</sup> レングリコール2000 (ジオール型)	0.6g
	メタノール	全容量 50ml

上記A液とB液とを混合して含浸液とし、これをクロマトグラフ用セルロース濾紙 (厚さ0.4mm) に浸漬した後、乾燥して試験片を作製した。

(3) 測定及び結果

各尿試料に、作製した試験片を浸して、プレテスターR M-405 (和光純薬工業 (株) 社製) により測定波長635nm (参照波長760nm) に於ける反射率を測定した。その結果を表1に示す。

物は、TITBS 1モルに対して酢酸1モルを有するものであった。

計算値 (%) : C 20.48、H 0.82

実測値 (%) : C 20.18、H 0.98

ヒトアルブミンを含まない尿試料 (Blank) 及びヒトアルブミン含有尿試料 (各15、100、300、1000mg/dl) を夫々調製した。

【0038】比較例1

実施例2の(2)に於いて、B液のTITBS 46.9mgの代わりにTBPB 39.4mg (0.04mmol) を用いた以外は、実施例2と同様にTBPB含浸試験片を作製し、同様にアルブミン測定を行った。その結果を表1に併せて示す。

【0039】

【表1】

試験片	項目	ヒトアルブミン (mg/dl 尿)					
		0 (Blank)	15 (痕跡)	30	100	300	10000
実施例2 (TITBS)	反射率	88.7	69.1	59.6	42.4	36.1	31.7
	反射率-BI	0	19.6	29.1	46.3	52.6	57.0
比較例1 (TBPB)	反射率	89.3	73.7	66.6	52.1	44.5	40.4
	反射率-BI	0	15.6	22.7	36.9	44.8	48.9

【0040】表1より明らかな如く、本発明のTITBS含浸試験片は、従来のTBPB含浸試験片と比較すると、ヒトアルブミン含有尿試料とブランクとの反射率差が大きくなり検出感度が上昇すること、特に痕跡量の検出感度が上昇していることが判った。更に、目視判定に於いても、ブランクと痕跡量の試料との色が明確に区別できた。従って、本発明のTITBSを指示薬として用いた方が、痕跡量から100mg/dl以上の蛋白質まで広範囲にわたって、蛋白質 (アルブミン) を高感度に測定可能

であることが判った。

【0041】

【発明の効果】以上述べた如く、本発明は生体試料中の蛋白質を測定できる指示薬、特に蛋白質測定用試験片を提供するものであり、本発明に係る3', 3'', 5', 5''-テトラヨードフェノール-3, 4, 5, 6-テトラブロムスルホンフタレイン (TITBS) を指示薬とした試験片を用いることにより高感度に蛋白質を測定することに顕著な効果を奏するものである。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

G O 1 N 33/68

識別記号

F I

G O 1 N 33/68

テ-マ-ト (参考)

(72) 発明者 三又 郁三

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工  
業株式会社大阪研究所内

F タ-ム (参考) 2G042 AA01 BD12 BD18 CB03 DA08  
FA11 FB07 FC01  
2G045 AA13 AA16 BA11 BB29 BB48  
BB52 CA25 CA26 CB03 DA36  
DA38 FA29 FB11 FB17 GC11  
HA10  
2G054 AA07 AB07 BA04 CA23 CE01  
EA05 GB01 GE06  
4C023 AA01